

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 9 月 19 日 (19.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/073181 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 27/327

(21) 国際出願番号:

PCT/JP02/02191

(22) 国際出願日:

2002 年 3 月 8 日 (08.03.2002)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2001-070421 2001 年 3 月 13 日 (13.03.2001) JP
特願2001-281985 2001 年 9 月 17 日 (17.09.2001) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 早出 広司 (SODE, Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南 1 丁目 1 3 番 1 6 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

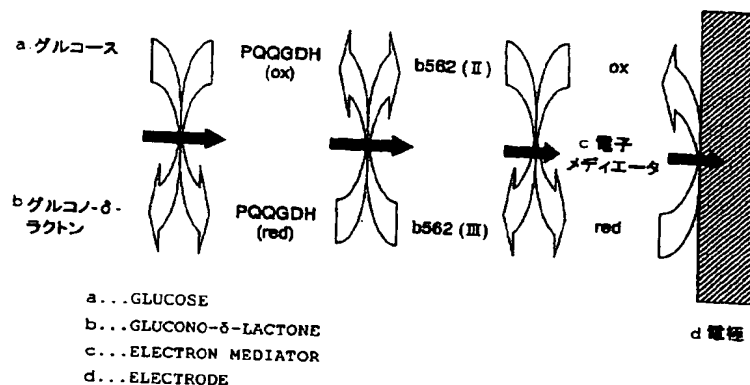
— 国際調査報告書

(74) 代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA, Reiko et al.); 〒100-6036 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル 3 6 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: OXYGEN ELECTRODE

(54) 発明の名称: 酵素電極



(57) Abstract: An oxygen electrode having an oxidoreductase (for example, glucose oxidase, cholesterol oxidase, fructosylamine oxidase, glucose dehydrogenase) and an electron transfer protein (for example, cytochrome C, cytochrome b562, cytochrome c551); and a sensor characterized by having this oxygen electrode as a working electrode. This oxygen electrode can provide a high response current value.

[続葉有]

WO 02/073181 A1

明細書
酵素電極

技術分野

- 5 本発明は、酵素電極およびこれを用いるバイオセンサーに関する。

背景技術

- 10 酵素電極とは、金電極、白金電極、カーボン電極等の電極表面上に酵素が固定化されている電極である。酵素電極は、酵素の反応特異性を利用して、種々の生理活性物質を特異的に検出するバイオセンサーとして広く用いられている。

- 例えば、血糖値を簡便かつ迅速に測定しうるグルコースセンサーが開発されている。グルコースセンサー素子としては、グルコースオキシダーゼ（GOD）が最もよく用いられている。GODは、熱に安定であり、安価に大量に供給される酵素であるため、頻繁に用いられてきた。さらに、電極への印加電圧を低下させて夾雑物質の影響を低くするために、測定系にフェリシアン化カリウム等の種々の電子メディエーターを加えることが試みられている。また、溶存酸素濃度に影響されないメディエーター型のセンサー素子としてグルコース脱水素酵素（GDH）を用いることができる。例えば補酵素結合型のPQQグルコース脱水素酵素（PQQGDH）の使用が試みられている（特開平10-243786、WO00/66744、WO00/61730）。
- 15
20

また、コレステロール酸化酵素、フルクトシルアミン酸化酵素等を用いて、それぞれ血中のコレステロールやフルクトシルアミンの濃度を測定するための酵素電極も研究されている（Electrochemistry, 68(11), 869-871, 2000）。

- 25 しかし、これらの酸化還元酵素を酵素電極に応用する場合、電極の応答電流値が低いことが問題であった。これは、これらの酸化還元酵素から電極への、あるいは電子メディエーターへの電子移動速度が低いことが原因である

従って、本発明は、より高い応答電流値を得ることができる酵素電極を提供することを目的とする。

62、フルクトシルアミン酸化酵素とシトクロームb562、グルコース脱水素酵素とシトクロームb562、ピロロキノリンキノンを経補酵素とするグルコース脱水素酵素(PQQGDH)とシトクロームb562、フラビンを経補酵素とするグルコース脱水素酵素とシトクロームb562。

5 本発明の酵素電極は、これらの酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とを電極表面上に固定化することにより製造することができる。好ましくは、これらの酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とは化学的に架橋された状態で電極上に装着される。架橋は、例えばグルタルアルデヒドを用いて行うことができる。

また、本発明の特に好ましい態様においては、本発明の酵素電極は、電子メディエーターを含まない系においても、高い応答電流値を与えることができる。

10 別の観点においては、本発明は、作用極として上述の本発明の酵素電極を用いることを特徴とするセンサーを提供する。

本明細書において用いる場合、センサーとは、目的とする被検物質の濃度を電気化学的に測定する測定系をいい、通常は、作用極(酵素電極)、対極(白金等)、および参照極(Ag/AgCl)等の3電極を含む。あるいは、通常の簡易血糖値システムに多様されている作用極と対極とから構成される2電極系でもよい。センサーはさらに、緩衝液および被検試料を入れる恒温セル、作用極に電圧を印加する電源、電流計、記録計等を含む。センサーは、バッチ型であってもフロー型であってもよい。このような、酵素センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えば Biosensors -Fundamental and Applications- Anthony P. F. Tuner, Isao Karube and Geroge S. Wilson, Oxford University Press 1987 に記載されている。

好ましくは、本発明のセンサーはさらに電子メディエーターを含む。電子メディエーターとは、本発明の酸化還元酵素から電極への電子伝達を媒介しうる非蛋白質性の金属錯体、有機化合物などの酸化還元物質をいい、例えば、フェリシアニ化カリウム、フェナジンメトサルフェート、フェロセンおよびこれらの誘導体が挙げられる。

図面の簡単な説明

注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。

図7は、グルコース酸化酵素とシトクローム b 5 6 2 を架橋固定化し、電子メディエータを添加しないで作成したセンサーの、グルコース試料注入への応答電流値のグルコース濃度依存性を示す。

- 5 図8は、コレステロール酸化酵素とシトクローム b 5 6 2 を架橋固定化し、電子メディエータとしてフェリシアン化カリウムを用いたセンサーの、コレステロール試料注入への応答電流値のコレステロール濃度依存性を示す。

- 図9は、フルクトシルアミン酸化酵素とシトクローム b 5 6 2 を架橋固定化し、電子メディエータを添加しないで作成したセンサーの、フルクトシルバリン試料
10 注入への応答電流値のフルクトシルバリン濃度依存性を示す。

図10は、種々の通性嫌気性腸内細菌のゲノム中の、*E. coli* B 由来 cyt.b562 と相同性を示す配列の同一性および類似性を示す。

図11は、種々の通性嫌気性腸内細菌のゲノム中の、*E. coli* B 由来 cyt.b562 と相同性を示す領域のアミノ酸配列を示す。

- 15 図12は、*E. coli* B 由来 cyt.b562 と *K. pneumoniae* 由来 cytb562 のアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子の配列を示す。枠で囲まれているアミノ酸残基はヘム鉄に配位する保存アミノ酸である。

図13は、PQQGDHの存在下においてグルコースを添加したときの *K. pneumoniae* 由来シトクローム b562 の還元を示す。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明の酵素電極は、その表面に酸化還元酵素および電子伝達蛋白質が固定化されていることを特徴とする。本発明の酵素電極は、酸化還元酵素が単独で固定化されている酵素電極よりも高い応答性を示す。

- 25 本発明において用いることができる酸化還元酵素の例としては、グルコース酸化酵素、コレステロール酸化酵素、乳酸酸化酵素、アルコール酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ビリルビン酸化酵素、フルクトシルアミン酸化酵素、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコース-3-脱水素酵素が挙げられる。特に好ましくは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素

を調製する方法は、例えば、E. Itagaki and L. P. Hager, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 1012-1019(1968)、F. Lederer et al., *J. Mol. Biol.*, 148, 427-448(1981)に記載されている。また、大腸菌由来シトクローム b 5 6 2 はペリプラズムに分泌される蛋白質であるため、細胞外膜を浸透圧ショックなどの方法により破壊することにより、シトクローム b 5 6 2 を精製し、調製してもよい。

あるいは大腸菌 B 株由来シトクローム b 5 6 2 の構造遺伝子が大腸菌ゲノムから単離し、これを大腸菌で機能する pTrc99A のような発現ベクターに挿入し、組換え大腸菌を作成した後、組換え大腸菌を培養し、その細胞破碎液からシトクローム b 5 6 2 を精製し、調製してもよい。大腸菌 B 株由来シトクローム b 5 6 2 の遺伝子配列は、*Eur. J. Biochem.* 202 (2), 309-313 (1991)に記載されている。

また、E. coli K 株から B 株由来シトクローム b 5 6 2 と類似する遺伝子がクローニングされている (Tower, M.K., *Biochem. Biophys. Acta.* 1143, 109-111 (1993))。この遺伝子是不活性であり、B 株由来のシトクローム b 5 6 2 と比べ、N 末端の 7 残基が欠失しており、かつシトクローム b 5 6 2 蛋白質中に 3 箇所の変異がある (Ile40Val, Ala123Ser, Gln126Lys; ただし、B 株由来 b 5 6 2 の N 末端の Met を 1 として表す)。E. coli K 株由来のシトクローム b 5 6 2 遺伝子の成熟蛋白質 (配列番号 6 の A l a 2 4 から A r g 1 2 9) をコードする領域を大腸菌で機能する分泌発現ベクターに挿入して組換え大腸菌を作成し、この大腸菌からシトクローム b 5 6 2 を調製してもよい。または、E. coli B 株由来の b 5 6 2 遺伝子の成熟蛋白質 (配列番号 8 の A l a 2 4 から A r g 1 2 9) をコードする領域を大腸菌で機能する分泌発現ベクターに挿入して組換え大腸菌を作成し、この大腸菌からシトクローム b 5 6 2 を調製してもよい。あるいは、B 株由来のシトクローム b 5 6 2 遺伝子の一部と K 株由来のシトクローム b 5 6 2 遺伝子の一部とを連結させ、これを大腸菌で機能する pTrc99A のような発現ベクターに挿入し、組換え大腸菌を作成した後、組換え大腸菌を培養し、その細胞破碎液からキメラシトクローム b 5 6 2 を調製してもよい。さらに、S. typhi, S. typhinulium, K. pneumomiae, Y. pestis, P. multocida, S. pneumoniae 等の細菌に由来するシトクローム b 5 6 2 を用いてもよい。

用いることができる。本発明のセンサーは、さらに電子メディエーターを含むことができる。電子メディエーターとしては、特に限定されないが、例えばフェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェート、フェロセンおよびその誘導体などを用いることができる。好ましくはフェリシアン化カリウムを用いる。

- 5 被検試料、例えばグルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、電子メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極としてPQQGDHとシトクロームCあるいはシトクロームb562を固定化した酵素電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。作用極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、恒温セルにグルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。
- 10

- 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2001-70421号および2001-281985号の明細書に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。
- 15

20 実施例

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 組換えシトクロームb562の調製

- Nikkila, H., Gennis, R.B. and Sligar, S.G., *Eur. J. Biochem.* 202 (2), 309-313 (1991) 及び Tower, M.K., *Biochem. Biophys. Acta.* 1143, 109-111 (1993) にしたが
- 25 い、以下の2組のオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、それぞれを用いて大腸菌、*Escherichia coli* DH5 α 株 (*E. coli* K 株) および *Escherichia coli* B 株のゲノムに対してPCR法によりシトクロームb562の構造遺伝子領域を増幅した。それぞれの大腸菌からのゲノムDNAの抽出方法は常法に従った。PCR

構造遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号 5 及び 6 に、またクローニング及び発現に用いた *E.coli* K 株のシトクローム b 5 6 2 の構造遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号 7 及び 8 に示す。

- 5 このようにして作成した組換え大腸菌を $50 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む L 培地にて 37°C で振とう培養し、集菌後、超音波破碎により細胞抽出液を得た。その結果、いずれの発現ベクターが形質転換されている組換え大腸菌においてもシトクローム b 5 6 2 由来の赤色が確認されシトクローム b 5 6 2 が水溶性蛋白質として生産されていることが明らかとなった。

- 10 この中で生産性の高かった形質転換体は発現ベクターとしてシグナル配列を含むシトクローム b 5 6 2 遺伝子が挿入された pTrc99A-KcybC と pTrc99A-BcybC が形質転換された株であり、いずれも大腸菌で発現され、ペリプラズムに大量に *E.coli* K 株および B 株由来のシトクローム b 5 6 2 が生産された。これらの組換え大腸菌を用いて、酵素電極作成に用いるシトクローム b 5 6 2 の調製を行った。

- 15 pTrc99A-BcybC あるいは pTrc99A-KcybC が形質転換された *E.coli* DH5 α 株を $50 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む 2 リットルの L 培地にて 37°C で発酵槽にて培養した。対数増殖期にさしかかったところで、組換え遺伝子の誘導発現を行うために IPTG を $300 \mu\text{M}$ 添加し、さらに、定常期にさしかかるまで培養を行った。集菌後、超音波破碎機により破碎し、細胞抽出液を得た。これを pH 7.2 の 10 mM MOPS 緩衝液で透析脱塩ののち、DEAE-Toyopearl による陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られた蛋白質は SDS PAGE により分子量 12.3 kDa であることが確認され、また、スペクトル解析からシトクローム b 5 6 2 の特徴的な 562 nm における還元スペクトルが観察され、精製したシトクローム b 5 6 2 が調製された。

25 実施例 2 PQQGDH とシトクローム C が固定化された酵素電極の作成

常法により精製した *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH 酵素溶液 ($3900 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$) に PQQ $1 \mu\text{M}$ 、 CaCl_2 1 mM となるように加え、30 分暗所室温でインキュベートした。これを、100 倍量の 1 mM CaCl_2 を含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で 1 晩透析した。シグマ社 (No. C-7752) から購入

れの電極のグルコース濃度 4.2mM での応答電流値を比較した。グルコース濃度 4.2mM での各電極の応答電流値は PQQGDH 単独固定化酵素電極では 0.5nA、PQQGDH とそのモル数の 100 倍量の cyt.c を固定している酵素電極では 22 nA が得られた。cyt.c を固定化することによって、PQQGDH のグルコースに
5 対する応答電流値が酵素単独の電極に比べ、約 40 倍になったことがわかった。

また、電極に固定化する cyt.C の量を変えて測定したところ、cyt.c の固定化量にほぼ比例して応答電流値に増加がみられた（データ示さず）。

実施例 4 PQQGDH とシトクローム b 5 6 2 が固定化された酵素電極の作成

常法により精製した *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 PQQGDH 酵
10 素溶液 (3900 U·mg⁻¹protein) に PQQ 1μM、CaCl₂ 1mM となるように加え、30 分暗所室温でインキュベートした。これを、100 倍量の 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) で 1 晩透析した。実施例 1 で示した方法で調製したシトクローム b 5 6 2 (cyt.b562) を 1mM となるように 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) に溶解し、100 倍量の 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) で一晩透析したもの
15 を調製した。

このようにして調製した PQQGDH (25unit, 0.64x10⁻¹⁰mol)、cyt.b562 サンプル (酵素の 100 倍モル量、0.64x10⁻⁸mol) を同時にカーボンペースト 20mg と混合し凍結乾燥した。これをよく混合した後、すでにカーボンペーストが約 40mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。

20 この電極 (酵素電極) を、1% のグルタルアルデヒドを含む 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) 中で 30 分室温で攪拌し、さらに 10mM Tris 緩衝液 (pH7.0) 中で、20 分室温で攪拌した。この電極は 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) 中で 1 時間以上室温で攪拌し、平衡化した。

実施例 5 PQQGDH とシトクローム b 5 6 2 と電子メディエーターとしての

25 フェリシアン化カリウムから構成されるセンサーを用いるグルコースの計測

恒温セルに 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液 (pH7.0) を入れ、メディエーターとして、終濃度 10mM フェリシアン化カリウムを加え、総量を 10ml とした。そこに作用電極として実施例 4 で作成した PQQGDH および cyt.b562 が固定されているカーボンペースト電極 (酵素電極)、対極として白

恒温セルに 1mM CaCl₂ を含む 10mM MOPS 緩衝液(pH7.0)を入れ、メディエーターを添加せずに総量を 10ml とした。そこに作用電極として実施例 6 で作成した PQQGDH および cyt.b562 が固定されているカーボンペースト電極（酵素電極）、対極として白金電極、参照極として Ag/AgCl 電極を挿入し、センサーを作成した。

測定は全て 25℃で行った。印加電位+400mV vs Ag/AgCl の電位を印加した。電流が定常になったところで、適当な濃度のグルコースを加えて増加した電流値を計測した。グルコースを加えていないときの電流値を 0A とした。

固定されている PQQGDH と当モル量の cyt.b562 が固定されている酵素電極、固定されている PQQGDH と 100 倍量の cyt.b562 が固定されている酵素電極のキャリブレーションカーブを図 5 に示した。それぞれの電極のグルコース濃度 5.0 mM での応答電流値を比較した。グルコース濃度 10 mM での各電極の応答電流値は、固定されている PQQGDH と当モル量の cyt.b562 が固定されている酵素電極では 0nA、固定されている PQQGDH と 100 倍量の cyt.b562 が固定されている酵素電極では 30nA が得られた。すなわち、PQQGDH と cyt.b562 を固定化した電極を用いることにより、センサーに電子メディエーターを添加しない条件でもグルコースが計測できることが示された。

実施例 8 グルコースオキシダーゼ (GOD) および組換え cyt.b562 が固定化されている酵素電極およびメディエーターを用いるセンサー

Aspergillus niger 由来のグルコースオキシダーゼ (101U/mg protein) 5 ユニットと E.coli によって組換え生産した Cytb562 4.3×10^{-8} mol (GOD に対して 100 倍モル量に相当する、0.6 mg) とカーボンペースト 20 mg とを混合し、凍結乾燥した後にカーボンペースト電極に装着した。この電極を 1% グルタルアルデヒド水溶液中で 30 分間放置し、蛋白質同士を架橋した。このようにして作成した酵素電極を作用極とし、参照極に Ag/AgCl、対極に Pt 電極を用いた。この電極を 10 mM フェリシアン化カリウムをメディエーターとして含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 に浸漬し、25℃でバッチ方式でグルコース添加に伴う応答電流値を測定した。印加電位は+400mV vs Ag/AgCl とした。比較対照として、Cytb562 を含まない GOD 固定化電極を同一の方法で作成し、グル

GOD と cyt.b562 を固定化した電極を用いることにより、センサーに電子メディエーターを添加しない条件でもグルコースが計測できることが示された。

実施例 10 コレステロールオキシダーゼ (COD) および cyt.b562 が固定化されている酵素電極およびメディエーターを用いるセンサー

- 5 コレステロールオキシダーゼ(COD; 12.77U/mg protein)1.5 ユニット(5.26×10^{-10} mol)と E.coli によって組換え生産した Cytb562 5.26×10^{-8} mol (COD に対して 100 倍モル量に相当する、0.789 mg)とカーボンペースト 20 mg とを混合し、凍結乾燥した後にカーボンペースト電極に装着した。この電極を 1 % グルタルアルデヒド水溶液中で 30 分間放置し、蛋白質同士を架橋した。このよう
- 10 にして作成した酵素電極を作用極とし、参照極に Ag/AgCl、対極に Pt 電極を用いた。この電極を 10 mM フェリシアン化カリウムをメディエーターとして含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 に浸漬し、25℃でバッチ方式でコレステロール添加に伴う応答電流値を測定した。印加電位は+400mV vs Ag/AgCl とした。比較対照として、Cytb562 を含まない COD 固定化電極を同一の方法で
- 15 作成し、コレステロール添加に伴う応答を測定した。コレステロール溶液は 5.0 mg の Triton X100 と 500mg のコレステロールとを混合、加熱融解後 90 ml の蒸留水を添加し煮沸冷却後、4.0g のコール酸ナトリウム塩を添加し溶解させた後、蒸留水を加え全量 100 ml としたものを標準溶液として調製した。

- 結果を図 8 に示す。Cytb562 を混合しない比較対照の電極においてもコレステ
- 20 テロール添加により応答電流値の増加がみられる (内側のグラフ; 白丸)。しかし、本システムでの計測においてはその応答値はコレステロール濃度 0.02mM で約 1 nA 程度であり、またこれ以上の濃度においてもほぼ応答は飽和していた。これに対して、Cytb562 を混合した COD 電極においては良好な応答性を示し、コレステロール 0.02mM においては 2 nA 以上と Cytb562 なしの場合の 2 倍以
- 25 上の応答を示した。さらに高濃度のコレステロールに対しても応答は飽和せず、0.5mM 以上の濃度測定も可能であった。その時の応答値は 20 nA 以上と Cytb562 を用いない電極の応答値の最大値の 20 倍近い値となった。

実施例 11 フルクトシルアミン酸化酵素 (FAOD) およびシトクローム b562 が固定化されている酵素電極およびメディエーターを用いるセンサー

が得られた。*Streptococcus pneumoniae* R6 の PskpA タンパク質 619 残基中の 210~280 残基に低い相同性領域を確認した。Pneumococcal surface protein A(PspA)タンパク質は脳炎などの感染症の原因である *S.pneumoniae* の幼児用の免疫として考えられているタンパク質であり、この 619 残基中の前半部の α ヘリックス領域と相同性が存在した。

また、これらのアミノ酸ホモロジー検索の結果をもとにポリペプチド間での保存残基を検索した。この結果、ヘム鉄と配位する N 末端側の Met7、C 末端側の His102 が保存され、配列全体では C 末端領域が保存されていることがわかった

(図 1 1)。この結果をもとに *cytb*₅₆₂ の立体構造上で保存されている残基を三次元で表示させると、4 番目の α ヘリックスに保存されたアミノ酸残基が多く存在することと、ヘム鉄と接近する 61・65 番目(シグナル配列を除く)の Phe 残基や 105 番目の Tyr 残基、ヘム鉄と配位する 102 番目の His 残基を含む芳香族環を持つ残基の保存も確認できた。この結果は *cytb*₅₆₂ と構造が類似している *cytc*'のヘム近傍に位置する芳香族アミノ酸(82Phe,86Trp,125Phe)が保存されている

報告と一致する (PC Weber, FR Salemme (1981) J.Biol.Chem. 256, 7702-7704)。*cytc*'は *cytb*₅₆₂ と同様に 4- α ヘリックスバンドルを形成し、この立体構造が同じ領域のアミノ酸残基の相同性は、17%と低い。しかし、両タンパク質の構造解析から *cytc*'・*cytb*₅₆₂ のヘム鉄と配位する 102His(*cytb*₅₆₂) 122His(*cytc*')の立体的な位置が一致することと、ヘム近傍の対応する位置にある芳香族アミノ酸

(*cytb*₅₆₂:61Phe,65Phe,105Tyr)(*cytc*':82Phe,86Trp,125Phe)の残基とヘムとの配置類似性があることが示された (PC Weber, FR Salemme (1981) J.Biol.Chem. 256, 7702-7704; Hamada K, PH Bethget and FS Mathews (1995) J.Mol.Biol. 247 947-962; PD Barker and AR Fersht (1999) Biochemistry 38, 8657-8670)。*cytb*₅₆₂ のヘムは内部の疎水残基のポケットに位置し、プロトヘムとその側鎖のプロピオン酸が溶媒に露出した状態で 102His と 7Met に配位されている。このとき、ヘム近傍に存在する 65Phe の側鎖はプロトヘムと平行に位置し、水素結合を形成している。また、61Phe,105Tyr もプロトヘムと相互作用していることから、これらの残基がヘムの配向に重要な残基であると考えられる。また、ヘム鉄と配位する

His102(*cytc*':122)や Met7(*cytc*':16 not coordinated)の立体的な位置は *cyt* の 1,4

- 菌体を 50mMp.p.b.(pH7.0)に懸濁して融解し、遠心分離(10,000×g,20min,4℃)し、上清に pH4~5 となるように HCl を加え、4℃で 1 時間攪拌し、その後 pH7 となるように NaOH を加えた。超遠心分離(5,0000rpm, 60min, 4℃)を行って上清を回収し、10mM MOPS 緩衝液(pH7.2)で一晩透析した。このサンプル
- 5 に対し、フェリシアン化カリウム (終濃度 10mM) を添加して、Cyt *b*₅₆₂ を酸化した後、PD-10 により脱塩した。このサンプルを陰イオン交換カラム(DEAE-5PW, A; 10mM MOPS pH7.2, B; 300mM NaCl, 10mM MOPS pH7.2, グラジエント 80%、9 カラム容量)およびゲル濾過(Superdex200, 300mM NaCl, 10mM MOPS pH7.2,)を行いて、精製 cytb₅₆₂ を得たのち PEG 濃縮を行った。SDS-
- 10 PAGE を行ったところ、14kDa 付近にシングルバンドが認められた。

- KNcyt.b の濃度は以下のようにして求めた。300nm~600nm の酸化型スペクトルを測定し、酸化型に特徴的なピーク(418nm,533nm)を確認した後に還元剤(ヒドロサルファイトナトリウム)を加え、還元型に特徴的なピーク(427nm,531nm,562nm)を測定した。還元型の $ABS_{562nm} - ABS_{578nm}$ の吸光度の
- 15 差スペクトルを求めて、E.coliB 由来 cytb₅₆₂ のモル吸光係数を用いて以下の計算式：

$$\text{KNcyt.b 濃度(mM)} = \text{ABS}_{562nm-578nm} \times 24.6 \times \text{希釈倍率}$$

にしたがって計算した。

実施例 1 4 K. pneumoniae 由来のシトクローム Cb562 の酸化還元電位

- 20 PQQGDH-B に、PQQ、CaCl₂ (各終濃度 1μM・1mM) を加え、室温でホロ化(30 分)させた後、サンプル中からの過剰な PQQ を除くため一晩透析(10mM MOPS pH7.0, 1mM CaCl₂)を行った。これを酵素サンプルとして、0.5U の GDH-B に対して特定倍モル量の KNcyt.b を加え、グルコース(終濃度 50mM)を添加して、単位時間あたりの還元型 cytb 値の増加を 562nm と 578nm の差スペ
- 25 クトルより求めた。PQQGDH - B 存在下におけるグルコース添加によって還元ピークの増加が見られた。また、PQQGDH - B の濃度(mol/l)に対する KNcyt.b の還元型の増加において濃度依存性が見られた (図 1 3)。すなわち、KNcyt.b と PQQGDH-B との間の直接電子移動が確認された。

実施例 1 5 PQQGDHと K. pneumoniae 由来のシトクローム Cb562 が固定

請求の範囲

1. 酸化還元酵素と電子伝達蛋白質とを有する酵素電極。
2. 酸化還元酵素がピロロキノリンキノンを経補酵素とする酸化還元酵素である、
- 5 請求項 1 記載の酵素電極。
3. 酸化還元酵素がフラビンを経補酵素とする酵素である、請求項 1 記載の酵素電極。
4. 酸化還元酵素が、グルコース酸化酵素、コレステロール酸化酵素、乳酸酸化酵素、アルコール酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ビリルビン酸化酵素、
- 10 フルクトシルアミン酸化酵素、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコース-3-脱水素酵素からなる群より選択される、請求項 1 記載の酵素電極。
5. 電子伝達蛋白質がシトクローム C である、請求項 1 記載の酵素電極。
6. 電子伝達蛋白質がシトクローム b₅₆₂ である、請求項 1 記載の酵素電極。
- 15 7. 電子伝達蛋白質が配列番号 6 の A l a 2 4 から A r g 1 2 9 または配列番号 8 の A l a 2 4 から A r g 1 2 9 のアミノ酸配列を有する蛋白質である、請求項 1 記載の酵素電極。
8. 電子伝達蛋白質がシトクローム c₅₅₁ である、請求項 1 記載の酵素電極。
9. 酸化還元酵素がグルコース酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b₅₆₂ である請求項 1 記載の酵素電極。
- 20 10. 酸化還元酵素がコレステロール酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b₅₆₂ である請求項 1 記載の酵素電極。
11. 酸化還元酵素が乳酸酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b₅₆₂ である、請求項 1 記載の酵素電極。
- 25 12. 酸化還元酵素がフルクトシルアミン酸化酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b₅₆₂ である、請求項 1 記載の酵素電極。
13. 酸化還元酵素がグルコース脱水素酵素であり、電子伝達蛋白質がシトクローム b₅₆₂ である、請求項 1 記載の酵素電極。
14. 酸化還元酵素がピロロキノリンキノンを経補酵素とするグルコース脱水素

1 / 1 1

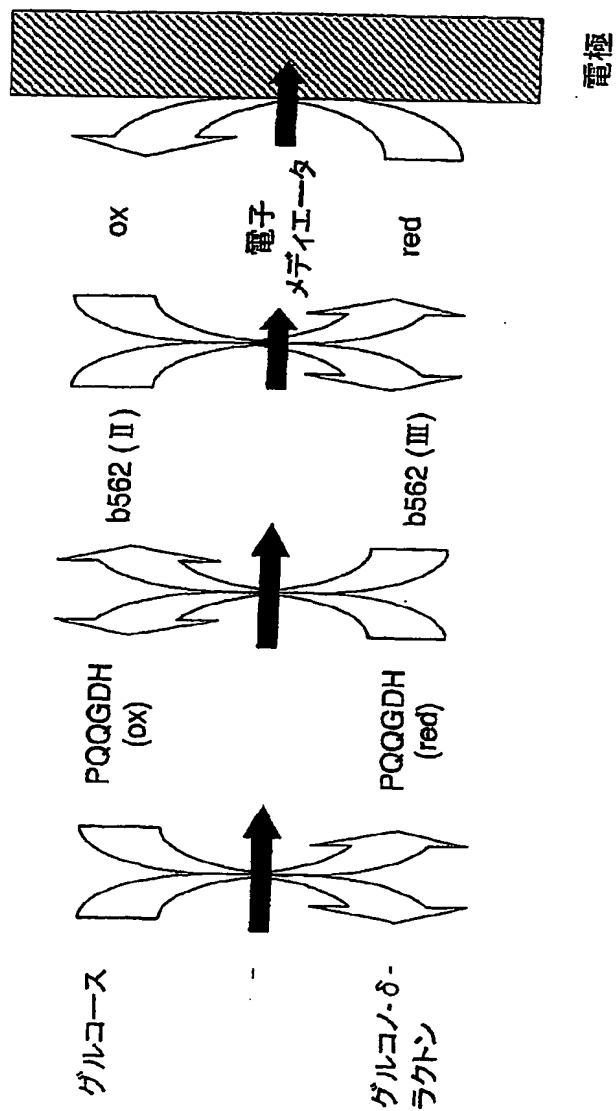


図 1

3 / 1 1

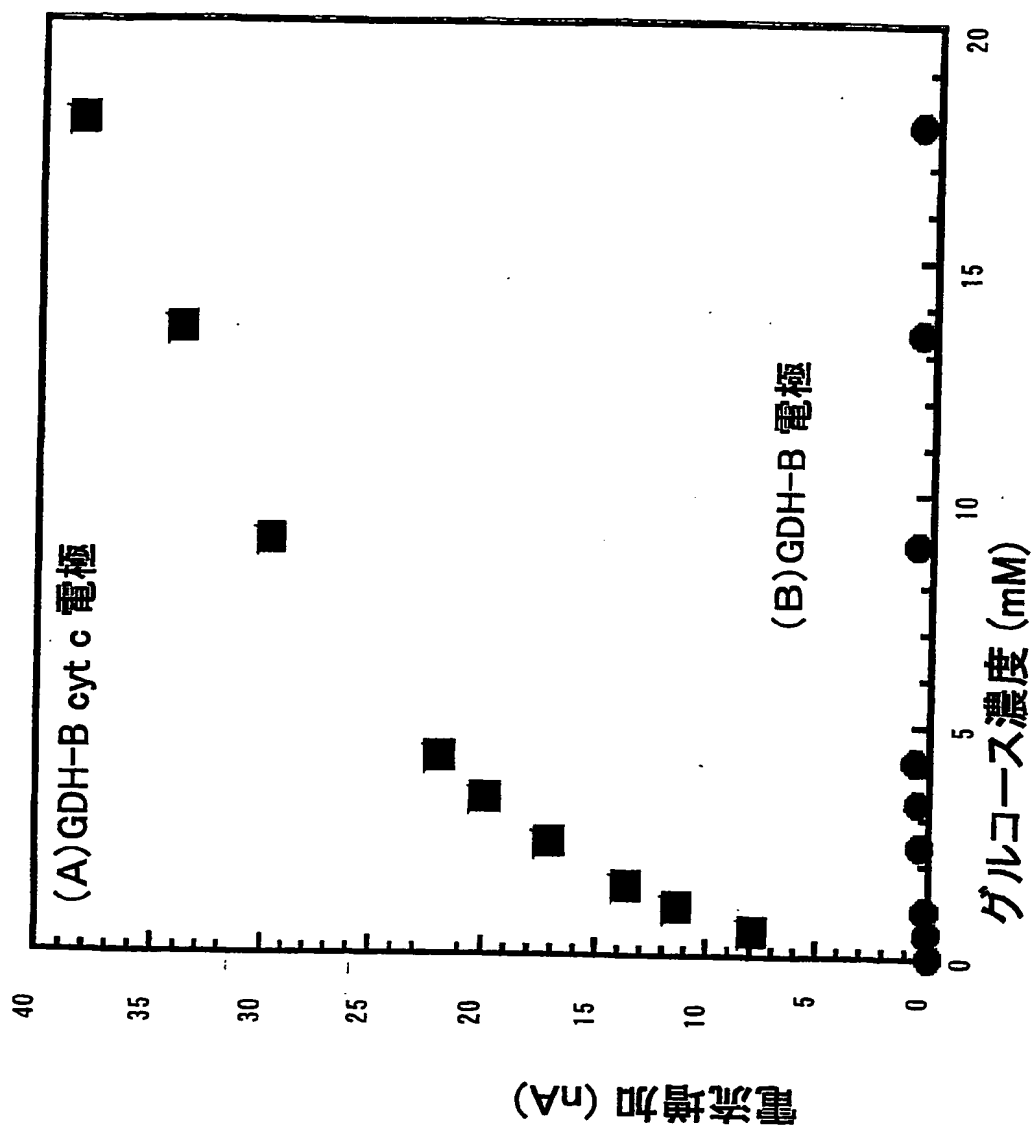


図 3

キャリブレーションカーブ

5 / 11

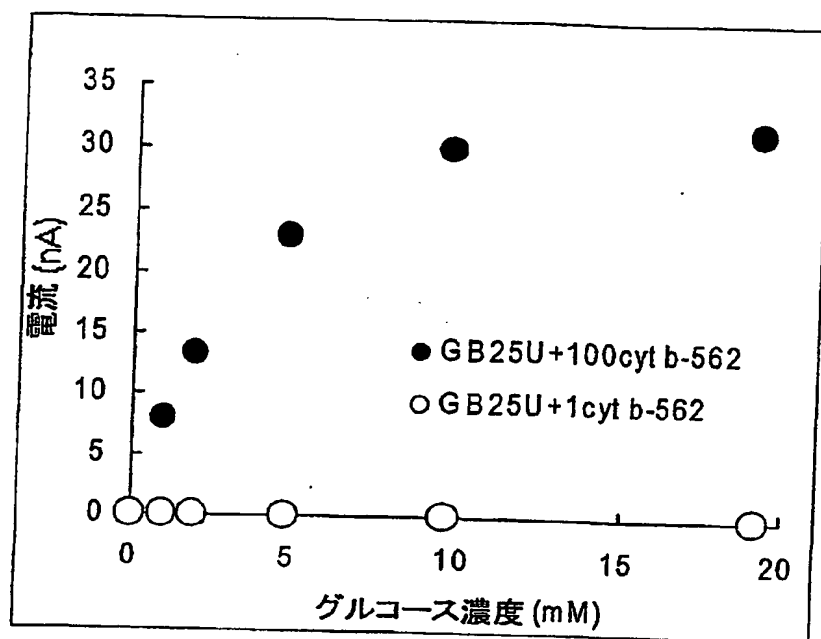


図 5

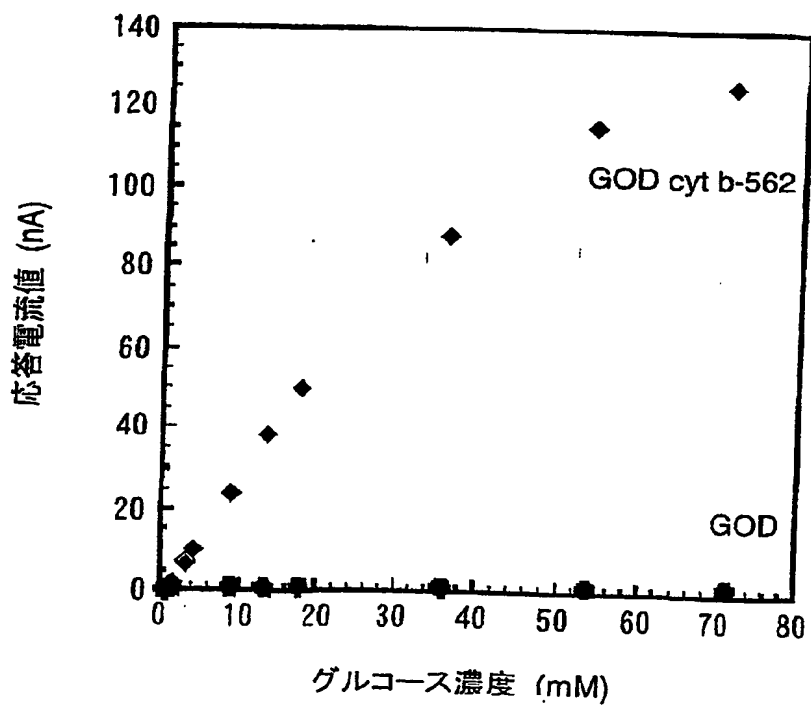
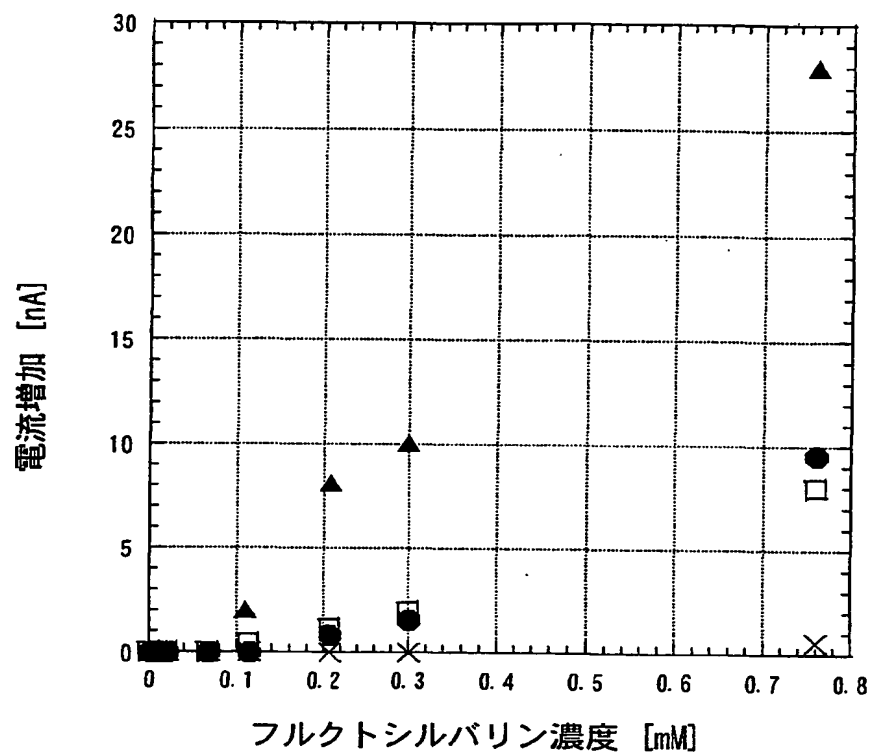


図 6

7 / 11



- FAOD
- FAOD+20BSA
- ▲ FAOD+20cytb₅₆₂
- × カーボンペースト

図 9

[illegible]

☒ II I

11/11

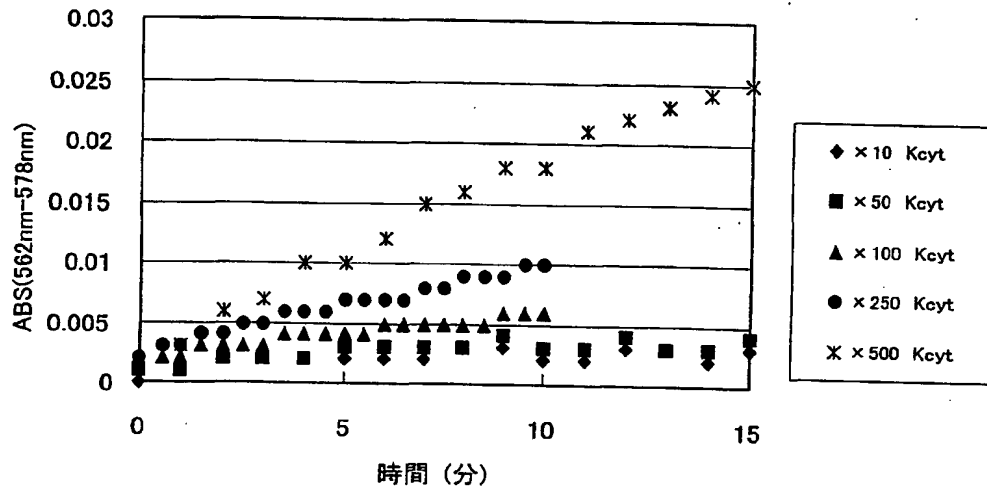


図 1.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02191

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-21526 A (Akebono Research and Development Center Ltd., International Center for Environmental Technology Transfer), 26 January, 2001 (26.01.01), Claims; Par. Nos. [0023], [0026], [0064]; Figs. 1 to 5	1, 4, 5, 16, 18, 20
Y	Par. No. [0064]	2, 3
Y	JP 2000-350588 A (Koji HAYAIDE), 19 December, 2000 (19.12.00), Par. No. [0023] (Family: none)	2
Y	JP 6-78791 A (Masao KARUBE), 22 March, 1994 (22.03.94), Par. Nos. [0009] to [0021] (Family: none)	3
A	JP 2000-312588 A (Koji HAYAIDE), 14 November, 2000 (14.11.00), Full text; Figs. 1 to 3 (Family: none)	1-6, 8-24
A	JP 2000-81408 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 21 March, 2000 (21.03.00), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none)	1-6, 8-24
A	JP 2000-35413 A (Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory), 02 February, 2000 (02.02.00), Full text; Figs. 1 to 7 (Family: none)	1-6, 8-24
A	JP 10-227755 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 25 August, 1998 (25.08.98), Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none)	1-6, 8-24
A	JP 2000-171428 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 23 June, 2000 (23.06.00), Full text; Figs. 1 to 11 & CN 1250161 A & EP 992589 A2	1-6, 8-24
P, X	Koji HAYAIDE, Junko IWAI, Yuka TAKAHASHI, Junko OKUDA, "Tennen Denshi Juyotai Koteika Glucose Censer no Kochiku", The Electrochemical Society of Japan 68th Taikai Koen Yoshishu, 25 March, 2001 (25.03.01), page 364	1, 2, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 22, 23
P, A	Junko OKUDA, Hiromi YOSHIDA, Koji HAYAIDE, "PQQ Glucose Dassuiso Koso to Cytochrome b562 tono Denshi Ido", CSJ: The Chemical Society of Japan, 79th Shunki Nenkai Koen Yokoshu II, 15 March, 2001 (15.03.01), page 896	1-6, 8-24

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N27/327

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N27/327

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2002年

日本国登録実用新案公報 1994-2002年

日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 63-246651 A(ユニチカ株式会社) 1988.10.13 特許請求の範囲、実施例1、第1-2図 全文、第1-2図 (ファミリーなし)	1, 5, 16, 20 2-4, 6, 8-15, 17-19 21-25
X A	JP 2001-21527 A(株式会社曙ブレーキ中央研究所、財団法人国際環境技術移 転研究センター) 2001.01.26 特許請求の範囲、段落番号【0026】、【0047】、第1-8図 全文、第1-8図 (ファミリーなし)	1, 5, 16, 20 2-4, 6, 8-15, 17-19 21-25

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.05.02

国際調査報告の発送日

18.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

黒田 浩一



2J

9218

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	早出広司、若井順子、高橋由香、奥田順子、天然電子受容体固定化グルコースセンサの構築、電気化学会第68会大会講演要旨集、2001.03.25、P.364	1, 2, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 22, 23
P A	奥田順子、吉田裕美、早出広司、PQQグルコース脱水素酵素とチトクロムb562との電子移動、日本化学会第79春季年会講演予稿集II、2001.03.15、P.896	1-6, 8-24